

Aus dem Institut für Rechtsmedizin
der Universität Erlangen - Nürnberg
Direktor: Professor Dr. H.-B. Wuermeling

Prüfung
einer Korrelation zwischen
der Vergiftbarkeit der menschlichen
Serum-Pseudocholinesterase (EC 3.1.1.8.)
mit Paraoxon (E 600) und DFP
bei 70 Personen, gemessen mit der
Anti - ChE - Technik in der
Warburg-Apparatur

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen - Nürnberg

vorgelegt von
Brigitte Burger
aus Bad Steben

Aus dem Institut für Rechtsmedizin
der Universität Erlangen - Nürnberg
Direktor: Professor Dr. H.-B. Wuermeling

Prüfung
einer Korrelation zwischen
der Vergiftbarkeit der menschlichen
Serum-Pseudocholinesterase (EC 3.1.1.8.)
mit Paraoxon (E 600) und DFP
bei 70 Personen, gemessen mit der
Anti - ChE - Technik in der
Warburg-Apparatur

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen - Nürnberg

vorgelegt von
Brigitte Burger
aus Bad Steben

Gedruckt mit Erlaubnis der Medizinischen Fakultät
der Universität Erlangen-Nürnberg



Dekan: Prof. Dr. W. Kersten
Referent: Prof. Dr. Dr. M. Geldmacher- v. Mallinckrodt
Korreferent: Prof. Dr. H.-B. Wuermeling

Tag der mündlichen Prüfung: 25. 02. 1980

INHALTSVERZEICHNIS

1.	EINLEITUNG	2
	Chemische Struktur von Alkylphosphaten, ihre Auswirkungen im Organismus und ihr enzyma- tischer Abbau, bezogen auf E 600 und DFP	
2.	PROBLEMSTELLUNG	9
3.	EIGENE UNTERSUCHUNGEN	10
3.1	Meßmethode nach Warburg	10
3.1.1	Allgemeine Versuchsanordnung	10
3.1.2	Anti - ChE - Technik	12
3.2	Material	13
3.3	Ansätze, Inkubations- und Meßbedingungen	13
3.3.1	Versuchsanordnung mit E 600	13
3.3.2	Versuchsanordnung mit DFP	16
4.	ERGEBNISSE UND AUSWERTUNG	19
4.1	Meßwerte von 70 untersuchten Personen	19
4.2	Vergleich der Hemmung durch Paraoxon und DFP	29
5.	DISKUSSION UND ZUSAMMENFASSUNG	30
6.	LITERATURÜBERSICHT	33

1. EINLEITUNG

Alle Muskelbewegungen des tierischen wie auch des menschlichen Körpers laufen nur ab, wenn das Nervensystem den Impuls dazu gibt. Entlang der Nervenbahnen wird dieser Reiz durch elektrische Potentialänderungen übertragen. Am Übergang zum Muskel jedoch übernimmt eine chemische Substanz, das Acetylcholin, die Transmitterfunktion. Diese Substanz muß im Bedarfsfall schnell freigesetzt, aber auch schnell wieder abgebaut werden. Das Enzym Acetylcholinesterase, das diese Abbaureaktion katalysiert, ist der Angriffspunkt einiger chemischer Verbindungen, die durch Blockierung der Esterase die Acetylcholinhydrolyse stoppen. Da der Körper nicht in der Lage ist, seine Cholinesterase rasch zu ersetzen, steigt der Acetylcholinspiegel in Gewebe und Blut laufend an und führt zu Dauerdepolarisationen an vielen erregbaren Membranen und damit zum Erlöschen lebenswichtiger cholinergischer Erregungstransmissionen, was den Tod des vergifteten Organismus zur Folge haben kann.

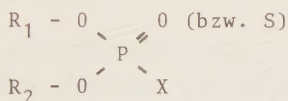
Es gibt reversible und irreversible Cholinesterasehemmer. Die reversiblen finden klinische Verwendung, z.B. zum Ruhigstellen der Muskulatur bei einer Narkose. Bei diesen kann die Blockierung der Cholinesterase durch Erhöhen der Acetylcholinkonzentration leicht wieder rückgängig gemacht werden.

Dies ist nicht der Fall bei Alkylphosphaten, die zu den irreversiblen Cholinesterasehemmern gehören. Diese organischen Phosphorsäureester verbinden sich fest mit dem Enzym und inaktivieren es durch Phosphorylierung.

Diese toxische Eigenschaft benützt man bei der Verwendung solcher Substanzen als Schädlingsbekämpfungsmittel.

Am bekanntesten ist wohl das unter dem Namen E 605 laufende 0,0-Diäthyl-0-(p-nitrophenyl)-thiophosphat geworden. Andererseits werden ähnliche Verbindungen allerdings auch als militärische Kampfstoffe in Betracht gezogen, wie z.B. das "Nervengas" Diisopropylfluorophosphat (DFP) (CLARKE 1969).

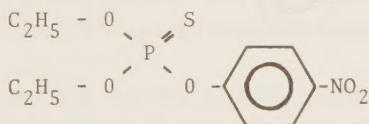
Die Grundstruktur dieser Organophosphorverbindungen ist nach SCHRADER (1950):



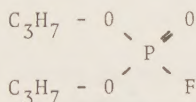
R_1, R_2 : Methyl-, Äthyl-, Isopropylrest

X: Azider Rest

E 605 zeigt folgenden Aufbau:



DFP gehört zu den Fluorphosphorsäureestern:



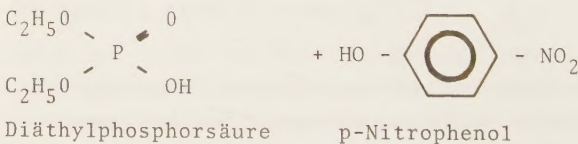
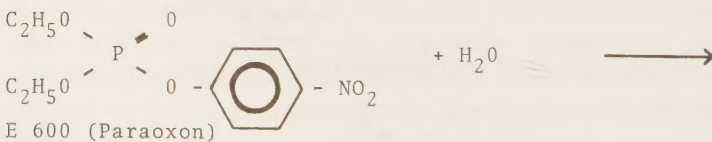
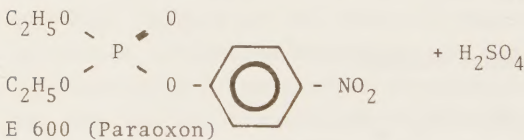
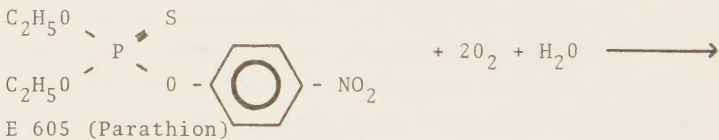
Die vermehrte Anwendung von organischen Phosphaten als Insektizide führte zu Untersuchungen über die Auswirkungen dieser Substanzen auf den menschlichen Organismus, der damit ja unweigerlich in Berührung kam.

Bei resistenten Insektenstämmen fand man Enzyme, die die Alkylphosphate hydrolysierten. Ähnliches vermutete man beim Menschen.

Thiophosphate, zu denen auch das E 605 gehört, werden in der menschlichen Leber durch Mikrosomenfermente oxydiert. Schwefel wird durch Sauerstoff ersetzt, es entsteht Paraoxon, das die Cholinesterase sogar noch stärker hemmt.

Anschließend erfolgt im Stoffwechsel eine enzymatische Hydrolyse (MAZUR 1946b, KOELLE 1963, NEAL 1967, 1971).

Rein schematisch läuft die Reaktion also folgendermaßen ab:



Das Enzym, das Paraoxon letztlich hydrolysiert, fand man in den Zellmikrosomen und im Serum. Deshalb diente hauptsächlich Blutserum als Enzymquelle für die Untersuchungen.

ALDRIDGE (1953a) arbeitete mit den Serumesterasen von Kaninchen, Ratte und Pferd. Von den beiden Typen, die er fand, erwies sich die eine als nicht hemmbar durch E 600 (A-Esterase), die andere als hemmbar (B-Esterase). A-Esterasen konnte er bei 10 verschiedenen Tierarten und beim Menschen nachweisen.

Wenig später (1953b) identifizierte er die A-Esterase im Serum von Kaninchen, Ratte und Pferd als ein E 600 spaltendes Enzym, das nicht zu den sauren oder alkalischen Serumphosphatasen gehörte.

AUGUSTINSSON und HEIMBÜRGER (1954) fanden bei sieben Tierarten und beim Menschen ein Enzym, das organische Phosphorverbindungen hydrolysierte. Sie nannten es "Phosphorylphosphatase".

FRIEDBERG und ERDMANN (1959) beobachteten eine Reaktivierung von Cholinesterase nach Vergiftung mit E 600 bei Pferde- und Rinderseren. Auch sie bezeichneten das gefundene Enzym als "Phosphorylphosphatase".

SKRINJARIK-SPOLJAR und REINER (1968) beschrieben die enzymatische Spaltung von E 600 und Armin (O-Äthyl-O (p-nitro-phenyl)-äthylphosphonat) durch menschliches Serum.

E 600 wurde bei ihren Versuchen schneller hydrolysiert als Armin, was auf ein Enzym mit bevorzugter Paraoxonase-Aktivität im Nativserum hinwies.

KRISCH (1968) zeigte, daß menschliches Serum E 600 in 10^{-4} molarer Konzentration enzymatisch spaltet. Das pH-Optimum dieser Reaktion liegt im alkalischen Bereich bei 11,0. Er fand zwei sich überlagernde Gruppen von Probanden, die sich durch die Höhe der Paraoxonase-Aktivität unterschieden. Als Ursache vermutete er genetische Varianten des Enzyms.

GELDMACHER V. MALLINCKRODT und LINDORF (1969) sowie GELDMACHER V. MALLINCKRODT, RABAST und LINDORF (1969) erhielten unter Verwendung einer anderen Meßmethode (Anti-Cholinesterase-Technik, s. 3.1.2, S. 12) eine Aufteilung in drei Gruppen mit niedriger, mittlerer und hoher Paraoxonase-Aktivität. Dabei gehörten ca. 58 % des untersuchten Kollektivs dem niedrigen Typ, 36 % dem mittleren und 6 % dem hohen Typ an (DUMBACH 1976). Gemessen wurde die Cholinesterase-Restaktivität nach Vergiftung mit E 600, die der Paraoxonase-Aktivität direkt korreliert ist. Der Nachweis dieser Korrelation gelang GELDMACHER V. MALLINCKRODT, BAUMGARTNER, PETENYI, BURGIS, LINDORF und METZNER (1972), sowie DUMBACH (1976) durch Vergleich mit der nach KRISCH photometrisch gemessenen Paraoxonase-Aktivität.

GELDMACHER V. MALLINCKRODT, LINDORF, PETENYI, FLÜGEL, FISCHER und HILLER (1973) machten Familienuntersuchungen, die auf eine genetische Determination des Paraoxonase-typus und ein einfaches zwei-Allele-System mit trimodaler Aktivitätsverteilung hinwiesen.

GELDMACHER V. MALLINCKRODT, PETENYI, FLÜGEL, BURGIS, DIETZEL, METZNER, NIRSCHL und RENNER (1973) prüften die Spezifität der menschlichen Serum-Paraoxonasen und stellten fest, daß das Enzym nur wenige andere, sterisch ähnliche Alkylphosphate abbaut, also ziemlich substratspezifisch ist.

Das zu Beginn bereits erwähnte DFP hat nun an Stelle der O-Nitrophenyl-Gruppe des E 600 ein Fluoratom. Es ist die toxischste Verbindung der Fluorphosphorsäureester und wurde in Deutschland erstmalig von SCHRADER synthetisiert. DFP ist ein besonders lipophiles Organophosphat mit hohem Dampfdruck.

Bei den Untersuchungen über den Abbau von DFP im tierischen und menschlichen Organismus kam man zu recht unterschiedlichen Ergebnissen.

MAZUR und BODANSKI (1946) fanden im Plasma und in den Geweben von Kaninchen und Menschen ein Enzym, das DFP hydrolysierte und nicht mit der Cholinesterase oder Phosphatase identisch war. Es gelang ihnen, das Enzym auf das 30-fache zu konzentrieren (1946b), wobei die Phosphatase-, Esterase- und Cholinesterase-Aktivität verschwand.

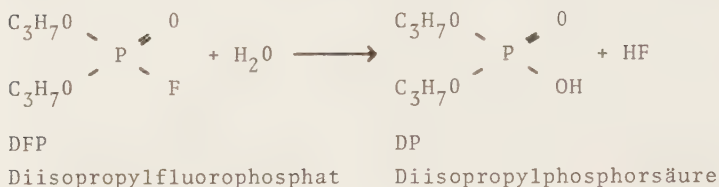
Sie nannten das Enzym "Phosphofluorase" bzw. "Fluorophosphatase" (GROB und Mitarbeiter 1947).

COHEN und WARRINGA (1954) injizierten Patienten intramuskulär DFP³². Sie stellten ein Maximum an Radioaktivität im peripheren Blut nach 90 min fest und entdeckten, daß ein kleiner Teil des P³² irreversibel an Erythrozyten und im Plasma gebunden wurde.

SCHAUMANN und SCHILLER (1960) untersuchten die Inaktivierung von Cholinesterasehemmern in Seren weißer Mäuse. Sie nahmen an, daß die Inaktivierung einerseits durch Adsorption an das Serum, andererseits durch enzymatischen Abbau erfolgt. Beides wurde für Paraoxon eindeutig nachgewiesen. DFP dagegen soll weder abgebaut noch adsorbiert werden.

HANSEN, WASSERMANN und SCHAUM (1967) bestimmten die Verteilung von injiziertem DFP in verschiedenen Organen sowie die Stoffwechselprodukte des Giftes bei Meerschweinchen. Die Messungen erfolgten mittels Radio-Dünnschichtchromatographie nach Injektion von H³-DFP.

Ein wesentlicher Teil des DFP wird im Organismus abgebaut:



Die Abbauprodukte DP und F^- sowie ein geringer Anteil ungespaltenes DFP werden hauptsächlich im Urin, aber auch mit der Galle ausgeschieden.

Nach H^3 -DFP-Injektion in niedrigen Dosen (0,1 mg/kg) fand man das Gift vor allem im Serum und auch in der Lunge der Versuchstiere gebunden. Höhere Dosen (3 und 6 mg/kg) verteilten sich über den ganzen Organismus und reicherten sich in Leber und Niere an.

0,1 mg DFP/kg führten zu keinen Vergiftungsreaktionen. 3 mg/kg und noch mehr 6 mg/kg hatten starke toxische Wirkung und brachten Symptome, die einer Vergiftung mit E 600 entsprachen.

In der Humanmedizin wird DFP als Bestandteil von Medikamenten gegen die Augenkrankheit Grüner Star (Glaukom) verwendet. Der Anstieg der AcetylcholinKonzentration nach Applikation dieses Cholinesterasehemmers führt zu einer Dauerkontraktion des M. sphincter pupillae und erleichtert dadurch den Abfluß der unter krankhaft hohem Druck stehenden Kammerflüssigkeit.

Bei Myasthenia gravis, einer allgemeinen Lähmung infolge Acetylcholinmangel an den Nervenendplatten, wird DFP angewendet, um den Abbau des Transmitterstoffes zu bremsen.

2. PROBLEMSTELLUNG

Der enzymatische Abbau von Alkylphosphaten wurde bisher bereits auf viele Aspekte hin untersucht und in manchen Bereichen genau geklärt. Besonders die Hydrolyse von E 600 durch die Serum-Paraoxonase war Gegenstand zahlreicher Arbeiten.

Die Existenz eines Polymorphismus dieses Enzyms wurde durch GELDMACHER V. MALLINCKRODT et al (1969, 1973) entdeckt und von ZECH und ZÜRCHER (1974) bestätigt. Bezüglich der Spezifität der Paraoxonase hat sich gezeigt, daß das Enzym die entsprechenden Thionophosphate Parathion, Methyl-Parathion und Chlorthion, außerdem Paraoxon-Homologe, bei denen die Nitrogruppe nicht in Parastellung steht, sowie die einfach und doppelt desalkylierten Paraoxonderivate nicht spalten kann (GELDMACHER V. MALLINCKRODT et al 1972, 1973).

In Fortsetzung dieser Spezifitätsuntersuchungen nimmt die vorliegende Arbeit die Prüfung einer Korrelation zwischen der Hemmung der menschlichen Serum-Cholinesterase-Aktivität durch Paraoxon einerseits und DFP andererseits mittels der Anti-ChE-Technik vor.

Es sollte geklärt werden, ob auch DFP im Serum enzymatisch abgebaut wird, und ob dies durch die Paraoxonase oder ein anderes Enzym geschieht.

3. EIGENE UNTERSUCHUNGEN

3.1 Meßmethode nach WARBURG

Chemische und biologische Reaktionen sind oft mit einem Gasaustausch verbunden. Die dabei verbrauchte oder entstandene Gasmenge ermöglicht die quantitative Erfassung solcher Vorgänge.

Aus dieser Überlegung heraus entwickelte der Physiologe und Nobelpreisträger Otto H. WARBURG eine manometrische Methode, um derartige Reaktionen anhand der auftretenden Druckänderung in einem geschlossenen System zu beobachten.

3.1.1 Allgemeine Versuchsanordnung:

Das verwendete Reaktionssystem besteht aus einem Reaktionsgefäß und dem damit verbundenen sogenannten Warburg-Manometer. Durch den Meniskus der Flüssigkeit in einem Schenkel der U-förmigen Manometer-Kapillare wird das Volumen des Reaktionsgefäßes abgeschlossen ("geschlossenes System"). Auf der anderen Kapillare lastet Atmosphärendruck. Der durch Kapillarkräfte oft unterschiedliche Stand beider Meniski muß vor Versuchsbeginn protokolliert werden.

Wenn die Gasmenge im Reaktionsgefäß nun während des Versuchs eine Veränderung erfährt, ergibt sich eine Druckdifferenz zwischen Reaktionssystem und Außendruck, die Flüssigkeitssäule im Manometer verschiebt sich. Am unteren Ende des Manometers befindet sich ein Quetschschlauch, mit dem man den Mensikus der Flüssigkeitssäule auf der Seite des Reaktionsgefäßes wieder auf den Anfangswert einstellen kann. Damit erhält man im Reaktionsgefäß wieder das Ausgangsvolumen und durch die Verschiebung der Flüssigkeitssäule im offenen Schenkel des Manometers ein Maß für die Druckänderung.

Die entstandene oder auch verbrauchte Gasmenge x berechnet sich dann als:

$$x \text{ (}\mu\text{l)} = K \cdot h \text{ (mm)}$$

Dabei ist:

h : abgelesene Druckdifferenz in mm Flüssigkeitssäule

K : Konstante, die alle Parameter der jeweiligen Versuchsbedingungen einschließt

Diese Konstante wird aus folgenden Parametern berechnet:

$V_g \text{ (}\mu\text{l)}$: Gasvolumen im Reaktionsgefäß, und zwar einschließlich des Volumens der Manometerkapillare bis zum Meniskus der Flüssigkeit

$V_f \text{ (}\mu\text{l)}$: Volumen der Flüssigkeitsmenge im Reaktionsgefäß

$p_o \text{ (mm Flüssigkeitssäule)}$: Normaldruck

$T \text{ (}^\circ\text{K)}$: Temperatur im Reaktionssystem

$\alpha \text{ (ml/ml)}$: Bunsenscher Absorptionskoeffizient als Maß für die Löslichkeit des entwickelten oder verbrauchten Gases in der im Reaktionsgefäß befindlichen Flüssigkeit (gültig für Normaldruck und eine bestimmte Temperatur).

Es gilt:

$$K = \frac{V_g \cdot \frac{273}{T} + V_f \cdot \alpha}{p_o} \text{ (}\mu\text{l/mm)}$$

Um eine gute Durchmischung der Flüssigkeit im Reaktionsgefäß und günstige Bedingungen für den Gasaustausch zu schaffen, werden die Reaktionsgefäße im Wasserbad mit einer den Versuchsbedingungen angepaßten Frequenz und Amplitude geschüttelt.

Untersuchungen nach der Warburg-Methode sind auch möglich, wenn zwar nicht durch die zu messende Reaktion selbst Gas freigesetzt oder verbraucht wird, in einer Folgereaktion aber doch der nötige Gasaustausch stattfindet. Zum Beispiel können entstehende Säureäquivalente aus einem Bicarbonatpuffer CO_2 freisetzen, was für die von uns verwendete Methode benützt wird.

3.1.2 Anti-ChE-Technik

Nach dieser Methode (GELDMACHER V. MALLINCKRODT et al 1969) wird die Aktivität der menschlichen Serum-Paraoxonase durch die Messung der Restaktivität der Serum-Cholinesterase nach Vergiftung mit E 600 in bestimmter Konzentration ermittelt. Die Angabe erfolgt in Prozent der unvergifteten Cholinesterase-Ausgangsaktivität.

Der Mechanismus der Meßreaktion beruht darauf, daß die Cholinesterase ihr Substrat, natürlicherweise Acetylcholin, in Cholin und Essigsäure aufspaltet. Die entstehende Säure setzt aus der bicarbonathaltigen Verdünnungsflüssigkeit Kohlendioxyd frei. Gemessen wird diese Gasmenge in der Warburg-Apparatur. (Manometrische Methode von AMMON (1934) in der Modifikation von FRIEDBERG und SAKAI (1958), jedoch bei pH 7,2; Warburg-Apparatur Typ V 85, Fa. Braun, Melsungen).

Für unsere Untersuchungen verwendeten wir als Substrat Butyrylcholinjodid, das von der (Pseudo-)Cholinesterase des Serums (EC 3.1.1.8.) sehr schnell abgebaut wird,

nicht jedoch von der Acetylcholinesterase der Erythrozyten (EC 3.1.1.7.).

Bei der Blutentnahme, beim Zentrifugieren oder durch zu langes Aufbewahren des Blutes kann es zu einer Hämolyse und damit zum Übertritt von Erythrozyten-Cholinesterase ins Serum kommen, was das Meßergebnis verfälschen würde. Durch die Verwendung des spezifischen Substrates Butyrylcholinjodid wird die Aktivität anderer Enzyme also ausgeschaltet und eine genaue Untersuchung ermöglicht (GOEDDE, DOENICKE, ALTLAND) (1967).

Außerdem beträgt beim Umsatz dieses Substrates bei gleicher Serummenge die CO_2 -Entwicklung mehr als das Doppelte als bei Verwendung von Acetylcholinchlorid, sodaß die Meßdauer verkürzt werden kann (LINDORF 1971, MEGERLE 1975).

3.2 Material

Als Untersuchungsmaterial dienten Seren von 70 Einzelpersonen, deren Cholinesterase-Restaktivität nach Vergiftung sowohl mit E 600 als auch mit DFP gemessen wurde. Dieses Kollektiv von Probanden setzte sich aus den Untersuchern, deren nicht blutsverwandten Angehörigen, sowie Freunden, Kollegen und sonstigen freiwilligen Spendern zusammen.

Mit Serummonovetten der Firma Sarstedt wurde den Probanden ca. 10 ml Venenblut entnommen und möglichst rasch nach der Entnahme zentrifugiert (1600 U/min, 20 min). Die Aufbewahrung des abpipettierten Serums erfolgte im Kühlschrank bei 5° C nicht länger als 2-3 Tage bis zur Messung.

3.3 Ansätze, Inkubations- und Meßbedingungen

3.3.1 Versuchsanordnung mit E 600:

Das Vorgehen bei den Messungen mit E 600 wurde von GELDMACHER V. MALLINCKRODT, RABAST und LINDORF (1969) sowie GELDMACHER V. MALLINCKRODT, LINDORF, PETENYI, FLÜGEL, FISCHER und HILLER (1973) entwickelt und bei allen bisherigen Meßreihen verwendet. Mit Testseren bekannter Aktivität stimmten wir anhand von Probeläufen unsere Arbeitsbedingungen auf diese Methode ab.

Herstellung der Giftlösung:

Mit einer geeichten Mikropipette wurde 1 µl E 600 mit 75 ml aqua bidest. gemischt und acht Minuten lang kräftig geschüttelt. 20 µl dieses Ansatzes wurden anschließend zu 27 ml einer Salzlösung pipettiert und wiederum acht Minuten gemischt. Diese Salzlösung diente auch als Verdünnungslösung für das Serum und bestand aus 10 Teilen einer 0,9%igen NaCl-Lösung und 3 Teilen einer 1,26%igen NaHCO_3 -Lösung.

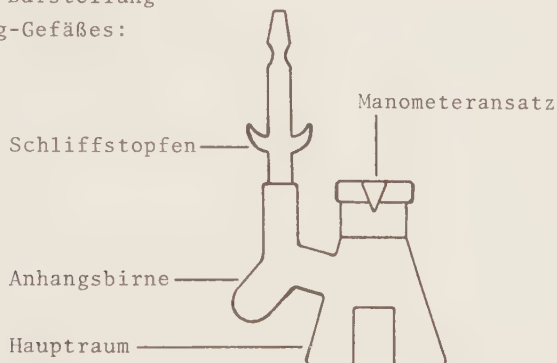
Inkubationsbedingungen:

Von jedem zu untersuchenden Serum wurden je 0,15 ml im Reagenzglas einmal mit 1,35 ml reiner Verdünnungslösung und zum anderen mit 1,35 ml E 600-Lösung versetzt und gut gemischt.

Mit diesen Ansätzen führten wir eine Doppelbestimmung durch und pipettierten deshalb aus jedem Reagenzglas je zweimal 0,5 ml in die Anhangsbirne eines Warburg-Gefäßes. Im Hauptraum des Kölbchens befanden sich 1,5 ml der Substratverdünnung, einer 0,54%igen Butyrylcholinjodidlösung.

Bei jedem Versuch liefen zwei Leerwerte mit, um die Eigenhydrolyse des Butyrylcholinjodid festzuhalten. Diese Kölbchen enthielten in der Anhangsbirne 0,5 ml reine Verdünnungslösung und im Hauptraum 1,5 ml Substratlösung.

Schematische Darstellung
eines Warburg-Gefäßes:



Danach wurden die Öffnungen der Anhangsbirnen mit den zugehörigen Schliffstopfen verschlossen, die Kölbchen mit Zugfedern an den Manometern befestigt und in das Wasserbad der Warburg-Apparatur eingehängt (Temperatur: 37° C). Ein Fettfilm auf den Glasschliffen aller Verbindungsstellen gewährleistete ihre Gasundurchlässigkeit.

Die Gesamtinkubationsdauer betrug 60 Minuten. Während der ganzen Zeit lief die Schüttelautomatik (Frequenz: 100/min) und die letzten 20 Minuten über wurden alle Manometer mit einem Gasgemisch aus 5 % CO₂ und 95 % N₂ begast.

Durch diesen Vorgang fiel der pH im Ansatz von vorher 7,7 auf 7,2 (SULLMANN 1961, 1964).

Messung:

Nach beendeter Inkubation wurde der Inhalt der Anhangsbirne in den Hauptraum gekippt, das enzymhaltige Serum also mit dem Substrat vermischt. Eine Drehung des Schliffstopfens um 90° verschloß die Anhangsbirnen. Die Manometerhähne blieben noch weitere drei Minuten offen, während dieser Zeit lasen wir die Vordifferenz der Flüssigkeitssäulen in den beiden Schenkeln ab.

Danach schlossen wir auch die Manometerhähne und protokollierten einmal nach 15 Minuten, dann nach 30 Minuten die Höhendifferenz der Flüssigkeit in den Manometerkappillaren. Falls die Flüssigkeitssäule nach 15 Minuten schon so hoch gestiegen war, daß eine genaue Ablesung am Versuchsende nicht gewährleistet schien, öffneten wir kurz das Manometer und addierten den 15-min-Wert später zum Endwert. Während der Versuchsdauer blieb die Schüttelautomatik bis auf die kurze Zeit des Ablesens ständig in Betrieb.

Insgesamt erhielten wir bei jedem Meßlauf Werte von drei verschiedenen Seren, da von den 14 Kölbchen der Warburg-Apparatur zwei als Leerwerte dienten und pro Proband zwei vergiftete und zwei unvergiftete Ansätze mitliefen.

Berechnung:

Die Werte für die Cholinesterase-Aktivität erhielten wir durch Multiplikation unserer Ableseergebnisse (nach 30 min) in mm abzüglich der Vordifferenz mit der jeweiligen Manometerkonstanten. Davon zogen wir noch den Leerwert des betreffenden Meßlaufes ab und mittelten die beiden Parallelbestimmungen.

Die Cholinesterase-Restaktivität, die der Paraoxonase-Aktivität entspricht, ergab sich aus dem Verhältnis der Aktivität im vergifteten Serum zu der im unvergifteten Serum eines jeden Probanden, angegeben in Prozent.

3.3.2 Versuchsanordnung mit DFP:

Die Methode zu Messungen mit DFP wurde von GREINER (1979) erarbeitet. Durch Versuchsläufe mit den Seren bereits untersuchter Probanden stellten wir eine Übereinstimmung unserer Arbeitsweise mit dieser Methode sicher.

DFP ist viel toxischer als E 600. Als Maß für die Toxizität von Alkylphosphaten wird oft die sogenannte I_{50} angegeben, d.h. die molare Konzentration, die nötig ist, um die Cholinesterase-Aktivität auf die Hälfte zu erniedrigen.

ROSIVAL et al (1959) fanden für menschliches Serum und E 600 eine I_{50} von $0,87 \cdot 10^{-8}$, für Pferdeserum eine $I_{50} = 1,4 \cdot 10^{-7}$. Im Vergleich dazu hat DFP, im Pferdeserum gemessen, eine I_{50} von $1,3 \cdot 10^{-9}$.

Daraus ergibt sich für unsere Versuchsanordnung mit DFP zwangsläufig eine niedrigere Giftkonzentration als bei den Versuchen mit E 600 (c_{E600} : $3,2 \cdot 10^{-8}$ molar). Die ermittelte Konzentration mit Meßergebnissen in günstigen Bereichen beträgt $8,5 \cdot 10^{-9}$ Mol/l im Giftansatz, im Inkubationsansatz ist die Konzentration dann $7,65 \cdot 10^{-9}$ molar (GREINER 1979).

Herstellung der Giftlösung:

Mit einer geeichten Mikropipette wurde 1 µl DFP in 90 ml aqua bidest. gelöst und acht Minuten kräftig geschüttelt. 5 µl dieses Ansatzes kamen auf 40 ml Verdünnungslösung, die die gleiche Zusammensetzung wie bei den Versuchen mit E 600 hatte.

Die in die Kölbchen pipettierte Mengen, die Inkubationsbedingungen und der Meßvorgang entsprachen genau dem Verfahren bei der Arbeit mit E 600, ebenso die Berechnung der Ergebnisse.

Allerdings erforderte die Arbeit mit DFP aufgrund des hohen Dampfdrucks dieses Giftes und seiner Toxizität gewisse Vorsichtsmaßnahmen, um eine Verfälschung der Meßwerte zu vermeiden:

- Aufbewahrung des konzentrierten Giftes in einem Tiefkühlgerät außerhalb des Meßlabors
- Herstellen des DFP-Ansatzes unter einer Abzugsanlage und auf jeden Fall außerhalb des Meßlabors, da sonst mit einer Vergiftung aller Seren in der Versuchsanordnung zu rechnen ist
- Aufbewahren des fertigen Giftansatzes in gut verschlossenem Gefäß im Kühlschrank, und zwar nicht zusammen mit dem Vorrat an Blutseren
- Gegenstände, die mit konzentriertem DFP in Berührung gekommen sind (Mikropipetten, Einmalhandschuhe usw.), nicht in den Meßraum bringen
- DFP dringt sehr rasch in die Haut ein, deshalb 2%ige NaOH-Lösung zum Waschen bereitstellen, das Gift ist alkaliempfindlich
- ➔ Das konzentrierte Gift darf nicht mit Lauge (z.B. alkalischen Reinigungsmitteln) in Berührung kommen, sonst wird es rasch unwirksam.

4. ERGEBNISSE UND AUSWERTUNG

4.1 Meßwerte von 70 untersuchten Personen

Die Blutseren unserer Probanden prüften wir möglichst unmittelbar nacheinander auf ihre Restaktivität nach Vergiftung mit E 600 sowie DFP.

Ein Vergleich der unvergifteten Ausgangsaktivitäten erlaubte uns dabei eine gewisse Kontrolle der Genauigkeit unserer Arbeit.

Die folgende Tabelle bringt eine Aufstellung unserer Versuchspersonen mit Angabe ihres Alters, ihren Ausgangs- und Restaktivitäten (Tab. 1).

Die Häufigkeitsverteilung der verschieden hohen Restaktivitätswerte in unserem Probandenkollektiv wird für beide Gifte in Histogrammen dargestellt (Abb. 1 und 2).

Die Darstellung im Wahrscheinlichkeitsnetz läßt Aussagen über eine unimodale Normalverteilung oder einen eventuellen Polymorphismus zu (Tab. 2, Abb. 3 und 4).

Tabelle 1: Ausgangs- und Restaktivitätswerte von 70 Probanden

Name	Alter (Jahre)	E 600-Messung		Rest- aktivität (%)	DFP-Messung			Rest- aktivität (%)
		Ausgangs- aktivität ($\mu\text{l CO}_2/30 \text{ min}$)	Rest- aktivität ($\mu\text{l CO}_2/30 \text{ min}$)		Ausgangs- aktivität ($\mu\text{l CO}_2/30 \text{ min}$)	Rest- aktivität		
Achatz, Reinhold	24	201	2,4	1,2	204	74,7		36,5
Bauer, Doris	26	97	2,8	2,9	96	13,7		14,3
Böckler, Betty	52	210	58,6	27,9	215	73,3		34,1
Böckler, Hans	53	181	32,4	17,9	188	45,1		24,0
Böttcher, Klaus	30	158	0,0	0,0	151	34,1		22,6
Büchler, Betty	48	157	1,6	1,0	150	44,2		29,5
Büchler, Hans	50	196	6,1	3,1	184	64,4		35,0
Burger, Dietrich	44	181	39,3	21,7	178	41,5		23,3
Dr. Burger, Hanns	50	210	56,7	27,0	213	60,1		28,2
Burger, Ilse	48	162	56,7	35,0	167	43,4		26,0
Burger, Veronika	40	146	31,7	21,7	142	31,7		22,3
Dr. Distler, Paul	40	225	121,9	54,2	213	65,2		30,6
Dürr, Dagmar	19	164	46,2	28,2	166	17,1		10,3
Dürr, Heike	17	195	74,7	38,3	184	25,2		13,7

Eigenstetter, Siegfried	26	181	26,4	14,6	172	29,9	17,4
Eisenträger, Herrmann	78	174	44,5	25,6	180	57,1	31,7
Engel, Reinhard	28	106	1,3	1,2	102	5,9	5,8
Fischer, Herrmann	36	130	5,8	4,5	121	29,0	24,0
Fischer, Michael	26	167	7,3	4,4	150	19,9	13,3
Franke, Jörg	20	208	31,2	15,0	208	67,2	32,2
Fuchs, Christine	20	186	6,1	3,3	178	46,3	26,0
Funk, Erhard	51	328	54,4	16,6	316	51,8	16,4
Funk, Inge	51	230	21,2	9,2	217	107,4	49,5
Geupel, Thomas	26	250	19,7	7,9	259	67,8	26,2
Gleiss, Werner	24	143	7,3	5,1	146	0,7	5,0
Greim, Eva	49	178	24,9	14,0	168	36,3	21,6
Greim, Gerhardt	51	127	0,4	0,3	129	19,3	15,0
Greim, Jochen	22	192	44,2	23,0	195	71,8	36,8
Hackeneis, Maria	57	176	28,3	16,1	191	93,2	48,8
Hahn, Gerhard	24	195	15,6	8,0	208	58,0	27,9
Hegenauer, Fritz	41	203	0,2	0,9	208	51,8	24,9
Heine, Ulrich	26	238	0,3	1,4	225	72,9	32,4
Holzner, Herbert	25	201	30,5	15,2	202	66,0	32,7
Köhler, Angelika	23	113	0,7	5,9	122	12,2	10,0
Köhler, Betty	46	109	0,4	3,9	109	4,2	3,9
Köhler, Eckehard	35	175	15,9	9,1	170	41,3	24,3

König, Walther	24	160	11,2	7,0	161	45,1	28,0
Kreller, Gottfried	26	146	0,8	5,3	157	30,1	19,2
Laubmann, Arno	72	229	24,3	10,6	242	100,9	41,7
Laubmann, Edith	58	192	0,8	0,4	188	47,9	25,5
Lindner, Walther	57	205	32,0	15,6	190	35,3	18,6
Lipp, Rudolf	65	197	23,8	12,1	195	49,5	25,4
Lipp, Ruth	63	176	51,9	29,5	175	40,1	22,9
Müller, Christian	31	150	0,9	5,8	161	29,8	18,5
Müller, Hans-Jürgen	27	227	0,6	2,8	250	65,0	26,0
Müller, Heidi	34	100	0,5	5,2	105	21,6	20,6
Otto, Bernd	21	186	44,3	23,8	191	65,9	34,5
Richter, Hedda	49	192	23,4	12,2	199	39,4	19,8
Richter, Max	54	195	10,2	19,9	182	26,7	14,7
Rösch, Wolfgang	22	116	0,6	5,2	118	16,2	13,7
Rückert, Joachim	25	152	22,6	14,9	146	21,5	14,7
Salz, Monika	27	167	38,2	22,9	162	22,5	13,9
Schricker, Elise	76	141	15,5	11,0	139	20,3	14,6
Schricker, Julius	78	131	0,5	0,4	125	0,8	6,5
Schwab, Erika	39	190	4,0	2,1	187	44,7	23,9
Dr. Spitzer, Wolfgang	27	257	36,0	14,0	257	79,7	31,0
Stauffert, Peter	24	189	21,9	11,6	202	55,3	27,4
Steiger, Norbert	24	239	78,1	32,7	227	71,5	31,5

Sterner, Johann	47	69	5,0	7,3	74	10,8	14,6
Sterner, Lotte	43	113	5,5	4,9	121	18,6	15,4
Thaesler, Klaus	28	144	14,5	10,1	155	33,6	21,7
Vogel, Jürgen	28	198	5,5	2,8	191	39,9	20,9
Volkmar, Dietrich	38	173	3,3	1,9	163	39,3	24,1
Wendel, Gabriele	28	168	25,4	15,1	162	16,4	10,1
Wichtermann, Rainer	40	254	26,7	10,5	254	66,5	26,2
Wirth, Rainer	29	251	132,0	52,6	248	145,8	58,8
Wissmann, Sonja	30	170	21,4	12,6	166	38,0	22,9
Wolfram, Berta	51	143	11,4	8,0	133	14,1	10,6
Wolfram, Karl	51	159	0,2	1,2	141	31,2	22,1
Würth, Walther	23	193	38,2	19,8	190	35,3	18,6

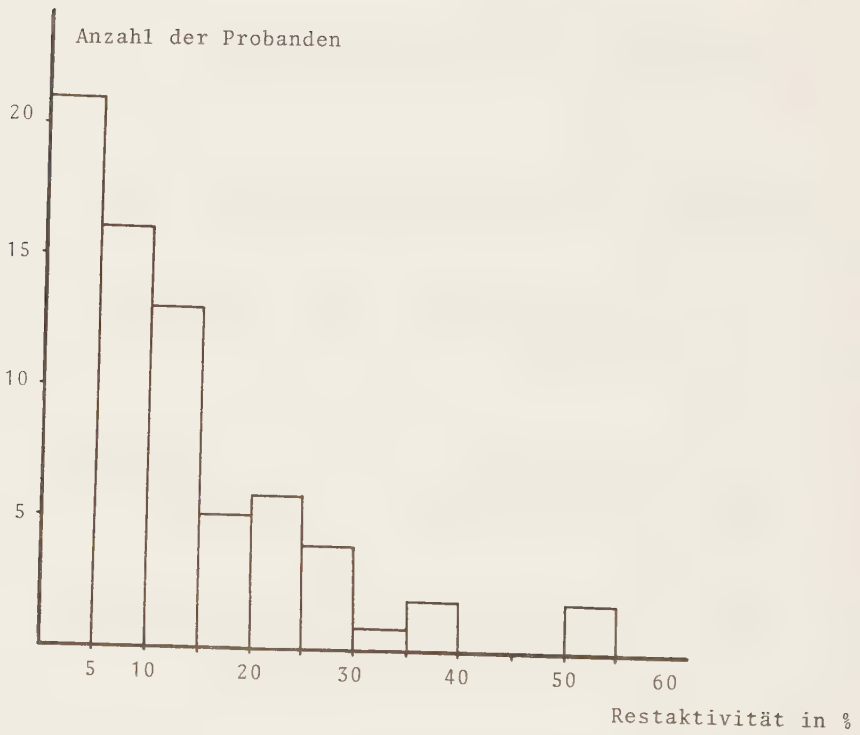


Abb. 1

Cholinesterase-Restaktivität im Serum von 70 Probanden
nach Vergiftung mit E 600

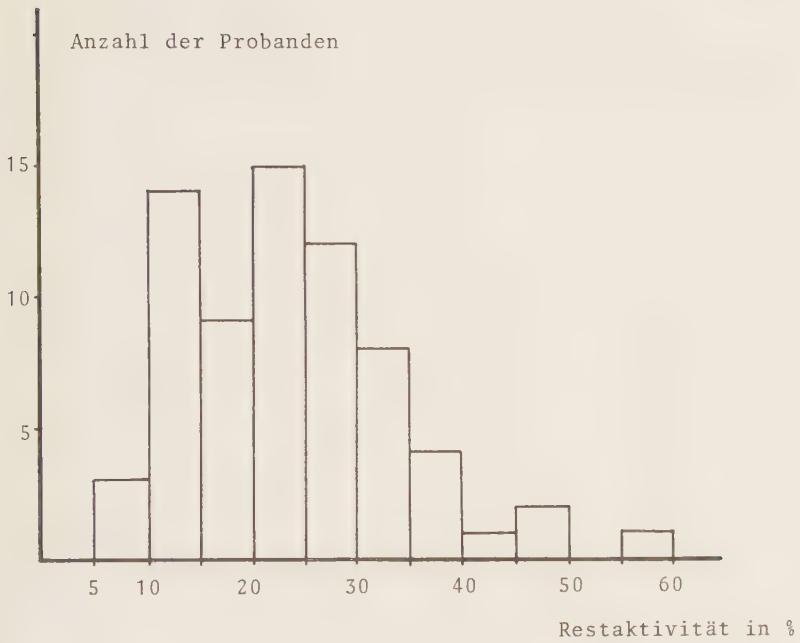


Abb. 2

Cholinesterase-Restaktivität im Serum von 70 Probanden
nach Vergiftung mit DFP

Tabelle 2:

Daten zu den Darstellungen im Wahrscheinlichkeitsnetz:

Bereich der Rest- aktivität in %	Anzahl der Fälle	Prozent der Gesamtzahl	Summen- häufigkeit
-------------------------------------	---------------------	---------------------------	-----------------------

E 600

0 - 5	21	30,0	30,0
5 - 10	16	22,86	52,86
10 - 15	13	18,56	71,42
15 - 20	5	7,14	78,56
20 - 25	6	8,58	87,14
25 - 30	4	5,71	92,85
30 - 35	1	1,43	94,28
35 - 40	2	2,86	97,14
40 - 45	0	0,0	
45 - 50	0	0,0	
50 - 55	2	2,86	100,0

DFP

5 - 10	3	4,28	4,28
10 - 15	14	20,0	24,28
15 - 20	9	12,86	37,14
20 - 25	16	22,86	60,0
25 - 30	12	17,14	77,14
30 - 35	8	11,43	88,57
35 - 40	4	5,71	94,28
40 - 45	1	1,43	95,71
45 - 50	2	2,86	98,57
50 - 55	0	0,0	
55 - 60	1	1,43	100,0

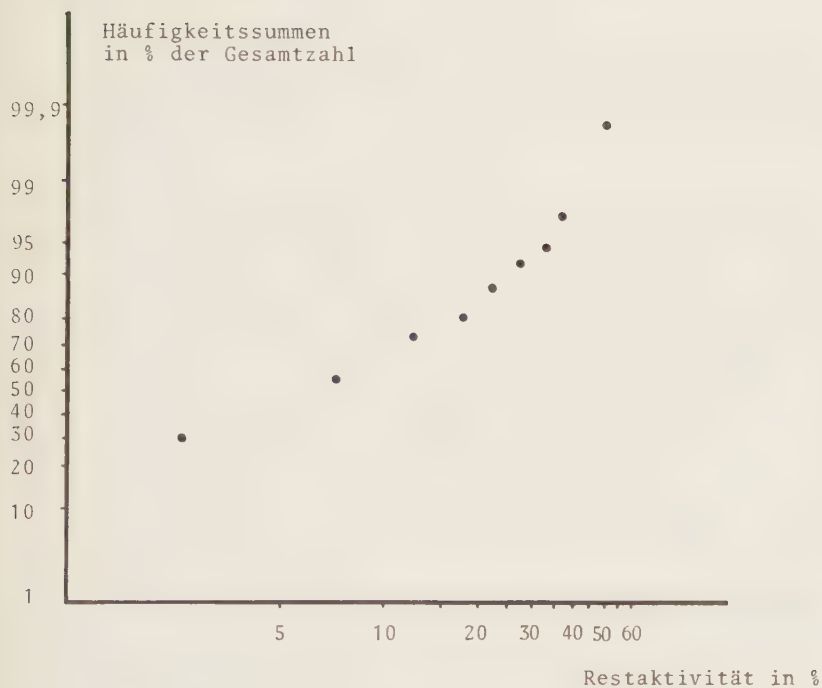


Abb. 3

Cholinesterase-Restaktivität im Serum von 70 Probanden
nach Vergiftung mit E 600

Darstellung im Wahrscheinlichkeitsnetz

(Abszisse logarithmisch, Ordinate nach dem Gauß'schen
Integral)

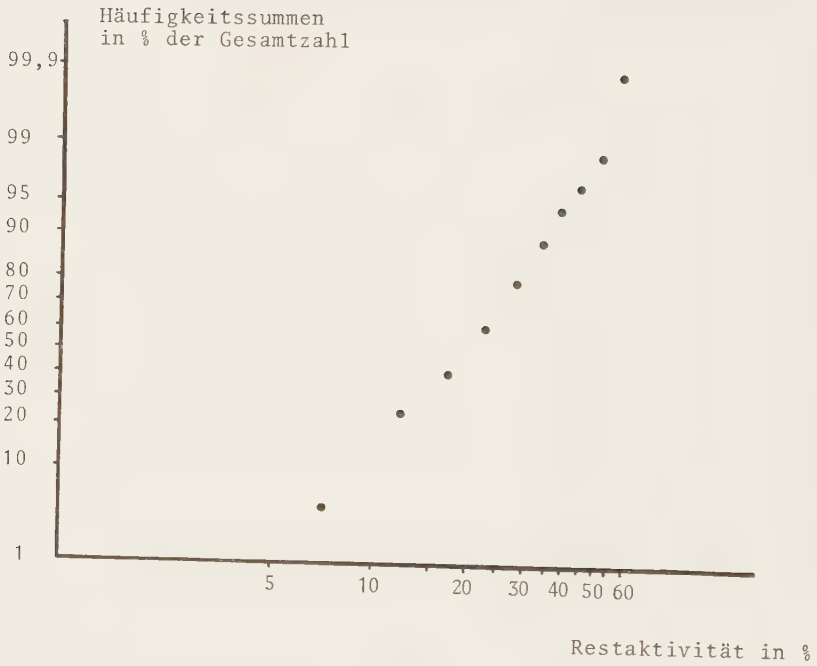


Abb. 4

Cholinesterase-Restaktivität im Serum von 70 Probanden
nach Vergiftung mit DFP
Darstellung im Wahrscheinlichkeitsnetz
(Abszisse logarithmisch, Ordinate nach dem Gauß'schen
Integral)

4.2 Vergleich der Hemmung durch Paraoxon und DFP

Für den Abbau von Paraoxon darf aufgrund eingehender Untersuchungen ein Polymorphismus von drei genetisch determinierten Enzymvarianten als gesichert angesehen werden.

Eine Korrelation der giftabbauenden Enzymaktivitäten für Paraoxon und DFP im menschlichen Serum würde also einen entsprechenden Polymorphismus auch bei DFP voraussetzen. Nun könnte man zwar am Histogramm der Aktivitäten nach DFP-Vergiftung eine gewisse Gruppeneinteilung ablesen, auch die Darstellung im Wahrscheinlichkeitsnetz ließe eine solche Interpretation zu. Andererseits könnte es sich aber genausogut um eine unimodale (Gauß'sche) Verteilung handeln, die durch den noch zu geringen Umfang des untersuchten Kollektivs verzerrt ist. Klarheit bringt ein direkter Vergleich der Meßwerte der einzelnen Probanden.

In Abb. 5 sind die beiden Restaktivitätswerte jeder Einzelperson gegeneinander aufgetragen. Eine Korrelation der Aktivitäten von Paraoxonase und eines DFP-abbauenden Enzyms würde sich graphisch in einer Geraden darstellen, was aber offensichtlich nicht der Fall ist. Der Korrelationskoeffizient beträgt 0,27.

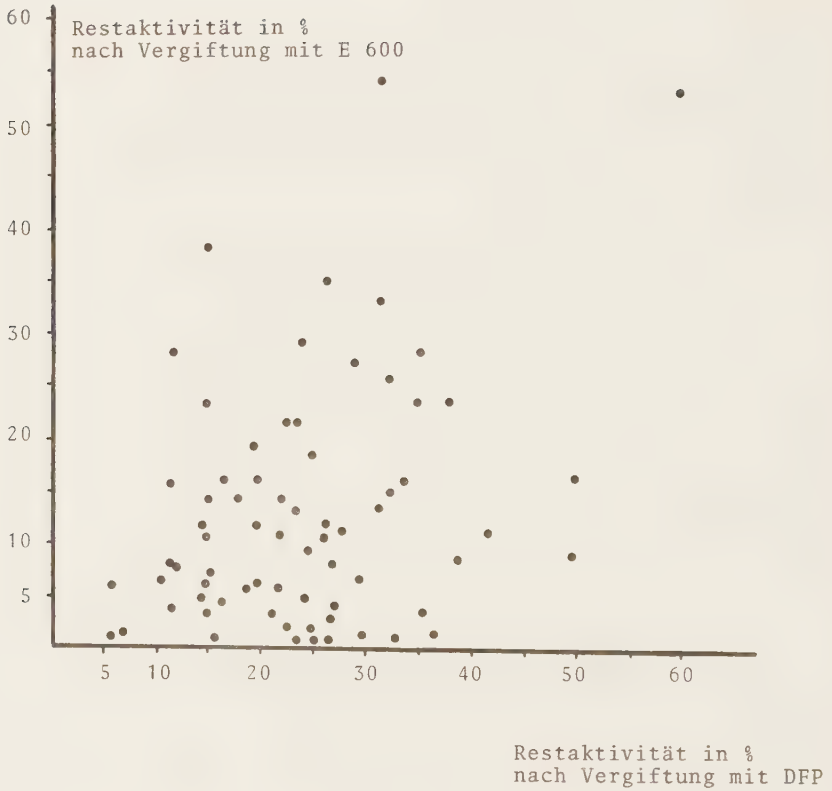


Abb. 5

Graphische Darstellung der Korrelation der Restaktivitäten im Serum von 70 Probanden nach Vergiftung mit E 600 und DFP.

Korrelationskoeffizient: 0,27

5. DISKUSSION UND ZUSAMMENFASSUNG

Ziel dieser Arbeit war es, eine eventuelle Korrelation zwischen der menschlichen Serum-Paraoxonase- und einer DFPase-Aktivität zu prüfen.

Die Messung erfolgte unter Anwendung der Anti-ChE-Technik in einer Warburg-Apparatur.

Untersucht wurden Blutseren von 70 nicht blutsverwandten Personen auf ihre Cholinesterase-Restaktivität hin, und zwar nach Vergiftung mit E 600 ($c = 3,2 \cdot 10^{-8}$ molar) und DFP ($c = 7,65 \cdot 10^{-9}$ molar).

Bei den Meßwerten mit E 600 ergab sich im Histogramm die typische trimodale Verteilung der drei genetischen Enzymvarianten, wie sie von GELDMACHER V. MALLINCKRODT et al (1969, 1973) sowie ZECH und ZÜRCHER (1974) entdeckt und bewiesen wurde. Auch die Darstellung im Wahrscheinlichkeitsnetz läßt zumindest andeutungsweise eine Dreigipfeligkeit erkennen.

Demgegenüber gleicht das Histogramm der Werte nach DFP-Vergiftung eher einer Gauß'schen Normalverteilung, die durch den noch zu geringen Umfang des untersuchten Kollektivs unregelmäßig verläuft.

Im Wahrscheinlichkeitsnetz bilden die aufgetragenen Meßwerte nahezu eine Gerade, den typischen Verlauf für eine unimodale, logarithmisch normale Verteilung.

Daraus kann man nun ableiten, daß eine eventuell existierende DFPase keinen Polymorphismus wie die Paraoxonase aufweist, daß also die Abbaumechanismen der beiden untersuchten Gifte schon aus diesem Grund nicht miteinander korreliert oder gar identisch sein können.

Belegt wird dieser Schluß weiterhin durch den direkten Vergleich der Meßwerte der einzelnen Probanden. Die entsprechenden Restaktivitätswerte lassen keine Proportionalität erkennen.

Durch unsere Untersuchungen haben wir also belegt, daß das Alkylphosphat DFP nicht durch das Enzym Paraoxonase abgebaut wird. Offen bleiben muß darüberhinaus die Frage nach der Existenz eines spezifisch DFP-abbauenden Enzyms überhaupt.

Die von uns gemessenen Restaktivitäten der Cholinesterase könnten ja möglicherweise nur auf Adsorptionsvorgängen im Serum oder auf einer zu geringen Giftkonzentration beruhen, die einen Teil der Cholinesterase von vorneherein wegen Giftmangels unvergiftet ließe.

In diesem Fall muß man dann annehmen, daß entweder kein DFP-abbauendes Enzym im Serum vorhanden ist, oder daß die Cholinesterase durch das Gift schneller inaktiviert wird als das Gift durch ein mehr oder weniger spezifisches abbauendes Enzym.

Klärung könnte die Entwicklung einer Untersuchungsmethode bringen, die das beim DFP-Abbau entstehende F^- direkt zu messen erlaubt, analog der spektrometrischen Methode, mit der KRISCH photometrisch den Polymorphismus der Paraoxonase nachwies.

Weiterhin stellt sich dann, ähnlich wie bei den bisherigen Arbeiten mit E 600, die Frage der Spezifität eines Enzyms DFPase z.B. gegenüber anderen Alkylphosphaten aus der Gruppe der Fluorphosphorsäureester.

Ziel weiterführender Untersuchungen muß es folglich sein, durch geeignete neue Meßmethoden und eine Erweiterung des Kollektivs die bisherigen Ergebnisse abzusichern und die angesprochenen offenen Fragen zu klären.

6. LITERATURÜBERSICHT

1. ALDRIDGE, W.N.
Serum esterases. 1. Two types of esterase hydrolysing p-nitrophenyl-acetate, propionate and butyrate, and a method for their determination. Biochem. J. 53 110 (1953a)
2. ALDRIDGE, W.N.
Serum esterases. 2. An enzyme hydrolysing diethyl-p-nitrophenyl-phosphate (E 600) and its identity with the A-esterase of mammalian sera. Biochem. J. 53 117 (1953b)
3. AMMON, R.
Die fermentative Spaltung des Acetylcholins. Pflügers Arch. ges. Physiol. 233 486 (1934)
4. AUGUSTINSSON, K.B. and HEIMBURGER, B.
Enzymatic hydrolysis of organophosphorus compounds. I-VI Acta chem. scand. 8 753, 762, 915, 1533 (1954)
9 310, 383, (1955)
5. BOECKLER, H.
Dissertation Erlangen, in Vorbereitung.
6. CLARKE, R.
Stumme Waffen. Chemische und biologische Kriegsführung. Zsolnay Wien/Hamburg (1969)
7. COHEN, J.A. and WARRINGA, M.G.P.J.
The fate of P^{32} labelled diisopropylfluorophosphate in the human body and its use as a labelling agent in the study of the turnover of blood plasma and red cells. J. clin. Invest. 33 459 (1954)

8. FRIEDBERG, K.D. und ERDMANN, W.D.
Spontane Reaktivierung der durch Alkylphosphate
(Paraoxon, Systox, Isosystox) blockierten Cholin-
esterase in vitro.
Naunyn Schmiedebergs Arch. exp. Path. und Pharm.
237 1 (1959)
9. FRIEDBERG, K.D. und SAKAI, P.
Spezifischer Nachweis von Vergiftungen mit Alkyl-
phosphaten (E 600, E 605, Systox) im Blut und Hirn-
gewebe mit Hilfe eines fermentreaktivierenden
Antidots (Pyridin-Aldoxim-Methyljodid = PAM).
Dtsch. Z. ges. gericht. Med. 47 580 (1958)
10. GELDMACHER V. MALLINCKRODT, M. und LINDORF, H.H.
Unterschiedliche Reaktion menschlicher Serumcholin-
esterasen mit Alkylphosphaten.
Vortrag auf der 48. Tagung der Deutschen Gesell-
schaft für Rechtsmedizin in Berlin, 6. - 9.10.1969
11. GELDMACHER V. MALLINCKRODT, M., RABAST, U. und
LINDORF, H.H.
Unterschiedliche Reaktion menschlicher Serumcholin-
esterasen mit E 600.
Arch. Toxikol. 25 223 (1969)
12. GELDMACHER V. MALLINCKRODT, M., BAUMGARTNER, W.,
PETENYI, M., BURGIS, H., LINDORF, H.H. und METZNER, H.
Korrelation zwischen der unterschiedlichen Vergift-
barkeit der Serumcholinesterase durch E 600 und der
Aktivität des E 600-spaltenden Enzym-Systems in
menschlichen Seren.
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 353 217 (1972)

13. GELDMACHER V. MALLINCKRODT, M., LINDORF, H.H.,
PETENYI, M., FLÜGEL, M., FISCHER, T. und HILLER, T.
Genetisch determinierter Polymorphismus der menschlichen Serum-Paraoxonase (EC 3.1.1.2.).
Humangenetik 17 331 (1973)
14. GELDMACHER V. MALLINCKRODT, M., PETENYI, M.,
FLÜGEL, M., BURGIS, H., DIETZEL, B., METZNER, H.,
NIRSCHL, H. und RENNER, O.
Zur Spezifität der menschlichen Serum-Paraoxonase.
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 354 337 (1973)
15. GOEDDE, H.W., DOENICKE, A. und ALTLAND, K.
Pseudocholinesterasen.
Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York (1967)
16. GREINER, G.
Methode zur Bestimmung der Restaktivität der Serum-Cholinesterase (EC 3.1.1.8.) im menschlichen Serum nach Vergiftung mit DFP.
Dissertation Erlangen (1979)
17. GRIMM, H.
Dissertation Erlangen, in Vorbereitung.
18. GROB, D., Lilienthal, J.L.J., HARVEY, A.M.
and JONES, B.P.
The administration of diisopropylfluorophosphate (DFP) to man.
Bulletin John Hopkins Hospital 81 217 (1947)
19. HANSEN, D., SCHAUM, E., und WASSERMANN, O.
Serum level and excretion of DFP in cats.
Biochem. Pharm. 17 1159 (1968)

20. KOELLE, G.B.
Cholinesterase and anticholinesterase agents.
Handbuch der experimentellen Pharmakologie.
Ergänzungswerk XV, Berlin, Göttingen, Heidelberg
(1963)
21. KOELLE, O.
Manometrie.
B. Braun Apparatebau, Melsungen
22. KRISCH, K.
Enzymatische Hydrolyse von Diäthyl-p-nitrophenyl-
phosphat durch menschliches Serum.
Z. Klin. Chem. Klin. Biochem. 6 41 (1968)
23. MAIER, T.
Dissertation Erlangen, in Vorbereitung.
24. MAZUR, A. and BODANSKI, O.
The mechanism of in vitro and in vivo inhibition of
cholinesterase activity by diisopropylfluorophosphate.
J. Biol. Chem. 163 261 (1946a)
25. MAZUR, A. and BODANSKI, O.
An enzyme in animal tissues capable of hydrolysing
the phosphorus-fluorine bond of alkylfluorophosphates.
J. Biol. Chem. 164 271 (1946b)
26. MEGERLE, U.
Vergleichende Untersuchungen zur optimalen Bestimmung
der Paraoxonasetypen im menschlichen Serum mit ver-
schiedenen Substraten.
Dissertation Erlangen (1975)

27. MÜLLER, C.
Dissertation Erlangen, in Vorbereitung.
28. NEAL, R.A.
Studies on the metabolism of diethyl-4-nitrophenyl-
phosphoro-thionate in vitro.
Biochem. J. 103 183 (1967)
29. ROSIVAL, L., VROBOVSKY, L. und SELECKY, F.V.
Toxikologia a farmakobiodynamika organofosforovych
zlucenin.
Bratislava Vydavatel stvo Slovenskej akademie vied
(1959)
Zitat nach LERKE, D. und KIMMERLE, G. (1968)
30. SCHAUMANN, W. und SCHILLER, M.
Inaktivierung von Alkylphosphaten im Gehirn und im
Serum.
Arch. exptl. Pathol. Pharmacol. 239 114 (1960)
31. SCHRADER, G.
Die Entwicklung neuer Insektizide auf Grundlage or-
ganischer Fluor- und Phosphorverbindungen.
Verlag Chemie Weinheim (1952)
32. SCHRADER, G.
Die Entwicklung neuer insektizider Phosphorsäureester.
Verlag Chemie Weinheim (1963)
33. SKRINJARIK-SPOLJAR, M. and REINER, E.
Hydrolysis of diethyl-p-nitrophenylphosphate and
ethyl-p-nitrophenylphosphate by human sera.
Biochem. Biophys. Acta 165 289 (1968)

34. SULLMANN, E.
Manometrische Methoden zur Untersuchung des Gewebs-
stoffwechsels.
Im Handbuch d. Physiol.- und Patholog.-Chem.Analyse.
Hgb. LANG, K. und LEHNARTZ, E., Bd. VI - A.
Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York (1964)
35. UMBREIT, W.W., BURRIS, R.H. and STAUFFER, J.F.
Manometric techniques
Burgess Publishing Company, Minneapolis (1964)
36. ZECH, R., ZÜRCHER, K.
Organophosphate splitting serum enzymes in different
mammals.
Comp. Biochem. Physiol. (B) 48 427 (1974)

Frau Prof. Dr.Dr. Geldmacher von Mallinckrodt gilt
mein besonderer Dank für die Überlassung des Themas,
die Übernahme des Referates und ihre freundliche
Unterstützung bei der Durchführung unserer Versuche
und der Abfassung dieser Arbeit.

Weiterhin danke ich Herrn Prof. Dr. Wuermeling für
die Übernahme des Korreferates, sowie den Angestellten
des Labors und allen unseren freiwilligen Blutspendern
für ihren Beitrag zur Durchführung unserer Unter-
suchungen.

LEBENS LAUF

Personalien: Name: Brigitte Maria Burger
 geb.: 18. Dezember 1954 in Bad Steben
 Eltern: Dr. Hanns Burger, Zahnarzt
 Ilse Burger, geb. Schrickner

Ausbildung: 1961 - 1965 Volksschule in Bad Steben
 1965 - 1974 Johann-Christian-Reinhart-
 Gymnasium in Hof
 Mai 1974 Abitur
 ab WS 1974 Studium der Zahnmedizin an der
 Friedrich-Alexander-Universität
 Erlangen-Nürnberg
 August 1975 Naturwissenschaftliche
 Vorprüfung
 April 1977 Zahnärztliche Vorprüfung
 November 1979 Zahnärztliche Prüfung

Copy-Center 2000

852 ERLANGEN · Obere Karlstr. 30
Tel. 09131-26197